



DEMANDE INTERNATIONALE PUBLIÉE EN VERTU DU TRAITE DE COOPERATION EN MATIÈRE DE BREVETS (PCT)

(51) Classification internationale des brevets ⁶ : C12N 15/86, A61K 48/00, C12N 7/01, A61K 39/235, C12N 5/10, 15/12		A1	(11) Numéro de publication internationale: WO 95/23867
			(43) Date de publication internationale: 8 septembre 1995 (08.09.95)
(21) Numéro de la demande internationale: PCT/FR95/00233		(81) Etats désignés: AM, AU, BB, BG, BR, BY, CA, CN, CZ, DE, FI, GE, HU, JP, KE, KG, KP, KR, LK, LR, LT, LV, MD, MG, MN, MW, MX, NO, NZ, PL, RO, RU, SD, SI, SK, TI, TT, UA, US, UZ, VN, brevet européen (AT, BE, CH, DE, DK, ES, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE), brevet OAPI (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, ML, MR, NE, SN, TD, TG), brevet ARPO (KE, MW, SD, SZ, UG).	
(22) Date de dépôt international: 28 février 1995 (28.02.95)			
(30) Données relatives à la priorité: 94/02445 3 mars 1994 (03.03.94)		FR	Publiée Avec rapport de recherche internationale.
(71) Déposant (pour tous les Etats désignés sauf US): RHÔNE-POULENC RORER S.A. [FR/FR]; 20, avenue Raymond-Aron, F-92160 Antony (FR).			
(72) Inventeur; et			
(75) Inventeur/Déposant (US seulement): DENEFLE, Patrice [FR/FR]; 45, avenue des Fossiliés-de-Chateaubriand, F-94100 Saint-Maur (FR). LATTA, Martine [FR/FR]; 141, rue de Paris, F-94220 Charenton-le-Pont (FR). PERRI-CAUDET, Michel [FR/FR]; 31, rue de Chartres, F-28320 Ercques (FR). VIGNE, Emmanuelle [FR/FR]; 60, rue Jean-le-Galleu, F-94200 Ivry-sur-Seine (FR).			
(74) Mandataire: BECKER, Philippe; Rhône-Poulenc Rorer S.A., Direction Brevets, 20, avenue Raymond-Aron, F-92160 Antony (FR).			
(54) Title: INTEGRATIVE RECOMBINANT ADENOVIRUSES, PREPARATION THEREOF AND THERAPEUTICAL USES THEREOF			
(54) Titre: ADENOVIRUS RECOMBINANTS INTEGRATIFS, LEUR PREPARATION ET LEUR UTILISATION THERAPEUTIQUE			
(57) Abstract			
<p>Recombinant adenoviruses comprising a cassette which can be integrated into the genome of infected cells, the preparation thereof, pharmaceutical compositions containing same, and uses of said adenoviruses, are disclosed. The cassette particularly contains at least one inverted terminal repeat (ITR) of an AAV and a heterologous DNA sequence.</p>			
(57) Abrégé			
<p>La présente invention concerne des adénovirus recombinants comportant une cassette capable de s'intégrer dans le génome des cellules infectées, leur préparation, les compositions pharmaceutiques les contenant, et leur utilisation. En particulier, la cassette contient au moins une séquence terminale inverse-répétée (ITR) d'AAV et une séquence d'ADN hétérologue.</p>			

UNIQUEMENT A TITRE D'INFORMATION

Codes utilisés pour identifier les Etats parties au PCT, sur les pages de couverture des brochures publient des demandes internationales en vertu du PCT.

AT	Autriche	GB	Royaume-Uni	MR	Maroc
AU	Australie	GE	Géorgie	MW	Malawi
BB	Burkina	GN	Guinée	NE	Niger
BZ	Belgique	GR	Grece	NL	Pays-Bas
BF	Burkina Faso	HU	Hongrie	NO	Norvège
BG	Bulgarie	IE	Irlande	NZ	Nouvelle-Zélande
RJ	Bénin	IT	Italie	PL	Pologne
BR	Bresil	JP	Japan	PT	Portugal
BY	Bélarus	KE	Kenya	RO	Roumanie
CA	Canada	KG	Kirghizistan	RU	Fédération de Russie
CF	République centrafricaine	KP	République populaire démocratique de Corée	SD	Soudan
CG	Congo	KR	République de Corée	SE	Suède
CH	Suisse	KZ	Kazakhstan	SI	Slovénie
CI	Côte d'Ivoire	LI	Liechtenstein	SK	Slovaquie
CM	Cameroon	LK	Sri Lanka	SN	Sénégal
CN	Chine	LU	Luxembourg	TD	Tchad
CS	Tchécoslovaquie	LV	Lettone	TG	Togo
CZ	République tchèque	MC	Monaco	TJ	Tadjikistan
DE	Allemagne	MD	République de Moldova	TT	Trinité-et-Tobago
DK	Danemark	MG	Madagascar	UA	Ukraine
ES	Espagne	ML	Mali	US	Etats-Unis d'Amérique
FI	Finlande	MN	Mongolie	UZ	Ouzbékistan
FR	France			VN	Viet Nam
GA	Gabon				

**ADENOVIRUS RECOMBINANTS INTEGRATIFS, LEUR PREPARATION
ET LEUR UTILISATION THERAPEUTIQUE.**

La présente invention concerne des vecteurs recombinants d'origine virale et leur utilisation thérapeutique. Plus particulièrement, elle concerne des adénovirus recombinants comportant une cassette capable de s'intégrer dans le génome des cellules infectées. L'invention concerne également la préparation de ces vecteurs, les compositions pharmaceutiques les contenant et leur utilisation pour le transfert de gènes *in vitro*, *ex vivo* et *in vivo*, notamment dans le cadre de thérapies génique et cellulaire.

La thérapie génique et cellulaire consiste à corriger une déficience ou une anomalie (mutation, expression aberrante, etc) ou à assurer l'expression d'une protéine d'intérêt thérapeutique par introduction d'une information génétique dans la cellule ou l'organe affecté. Cette information génétique peut être introduite soit *in vitro* dans une cellule extraite de l'organe, la cellule modifiée étant alors réintroduite dans l'organisme, soit directement *in vivo* dans le tissu approprié. Différentes techniques ont été décrites pour le transfert de cette information génétique, parmi lesquelles des techniques diverses de transfection impliquant des complexes d'ADN et de DEAE-dextran (Pagano et al., *J.Virol.* 1 (1967) 891), d'ADN et de protéines nucléaires (Kaneda et al., *Science* 243 (1989) 375), d'ADN et de lipides (Felgner et al., *PNAS* 84 (1987) 7413), d'ADN et de polylysine, l'emploi de liposomes (Fraley et al., *J.Biol.Chem.* 255 (1980) 10431), etc.

Plus récemment, l'emploi de virus comme vecteurs pour le transfert de gènes est apparu comme une alternative prometteuse à ces techniques physicochimiques de transfection. A cet égard, différents virus ont été testés pour leur capacité à infecter certaines populations cellulaires. En particulier, les rétrovirus (RSV, HMS, MMS, etc), le virus HSV, les virus adéno-associés, et les adénovirus. Toutefois, les vecteurs viraux développés jusqu'à présent ne permettent pas de résoudre de manière satisfaisante toutes les difficultés liées au transfert de gènes dans les cellules et/ou l'organisme. Ainsi, l'adénovirus, qui possède des propriétés attrayantes pour le transfert de gènes (possibilité de produire des titres élevés, faible pathogénicité) est un virus extrachromosomique. De ce fait, dans les cellules en division, le virus recombinant est dilué au cours des générations et finit par disparaître totalement des cellules filles. En revanche, alors que les vecteurs rétroviraux ou dérivés des virus adéno-associés (AAV) sont capables de s'intégrer dans le génome des cellules qu'ils

infectent, ils ne peuvent être produits en quantités élevées, ni par exemple incorporer des transgènes de taille importante.

La présente invention apporte une solution avantageuse à ces problèmes. La présente invention réside en effet dans la mise au point de vecteurs recombinants utilisables en thérapie génique, possédant les propriétés d'infection d'un vecteur adénovirus recombinant et permettant l'intégration d'une séquence hétérologue dans le génome de la cellule ou l'organe infectés.

Un premier objet de l'invention concerne plus particulièrement un adénovirus recombinant défectif comprenant une cassette capable de s'intégrer dans le génome des cellules infectées.

Généralement, la cassette comprend une séquence d'ADN désirée, le plus souvent hétérologue vis-à-vis de l'adénovirus, et des éléments permettant son intégration dans le génome des cellules infectées. De manière avantageuse, les éléments permettant l'intégration sont d'origine virale. Ainsi, les vecteurs de l'invention combinent des propriétés de deux types de virus : les adénovirus et les virus intégratifs.

Les vecteurs de l'invention sont particulièrement avantageux puisqu'ils peuvent être produits avec des titres élevés, ne sont pas pathogènes, possèdent un large spectre d'hôte, sont capables d'incorporer des séquences d'ADN hétérologue de taille importante, et d'intégrer lesdites séquences dans le génome des cellules infectées.

De plus, les vecteurs de l'invention permettent de limiter les risques de dissémination de la séquence d'ADN que l'on désire transférer à la cellule ou l'organisme. Une fois celle-ci intégrée dans le génome, elle ne peut plus être excisée et incorporée dans une particule virale infectieuse.

En outre, les vecteurs de l'invention permettent avantageusement de transférer aux cellules une séquence d'ADN totalement dépourvue de gènes viraux. En effet, la cassette permettant l'intégration dans le génome peut être totalement dépourvue de toute séquence codante d'origine virale. Les seules régions virales qui peuvent être introduites sont les éléments d'intégration.

Par ailleurs, selon la construction utilisée, les vecteurs de l'invention permettent une intégration de la séquence d'ADN hétérologue en un site précis du génome de la cellule infectée, et sans cytotoxicité.

Préférentiellement, les éléments permettant l'intégration de la cassette sont constitués par une ou plusieurs séquences terminales répétée-inversées. Encore plus

préférentiellement, les éléments permettant l'intégration de la cassette sont constitués par une ou plusieurs séquences terminales répétée-inversées d'un virus adéno-associé (AAV).

5 Un objet préféré de l'invention concerne donc un adénovirus recombinant défectif comprenant une cassette contenant au moins une séquence terminale répétée-inversée d'AAV et une séquence d'ADN hétérologue.

10 La demanderesse a en effet montré que, de manière particulièrement avantageuse, il est possible d'utiliser les propriétés d'intégration de l'AAV ("adeno-associated virus") pour construire un vecteur viral selon l'invention, tel que défini ci-dessus.

15 Les AAV, comme les adénovirus, sont des virus pathogènes bénins des voies aériennes. En l'absence de virus auxiliaire, les AAV possèdent la propriété de s'intégrer de façon stable, sous forme d'un provirus, en un site préférentiel du génome des cellules humaines (région du chromosome 19). Le génome des AAV a été cloné, séquencé et caractérisé. Il comprend environ 4700 bases, et contient à chaque extrémité une région terminale répétée-inversée (ITR) de 145 bases environ. Le reste du génome est divisé en 2 régions essentielles portant les fonctions d'encapsidation : la partie gauche du génome, qui contient le gène rep impliqué dans la 20 réplication virale et l'expression des gènes viraux; la partie droite du génome, qui contient le gène cap codant pour les protéines de capsid du virus.

25 Les régions terminales répétée-inversées (ITR) des AAV servent d'origine de réplication pour le virus, et sont également responsables de l'intégration du virus dans le génome des cellules infectées. Il a maintenant été montré qu'il est possible d'introduire une ou plusieurs de ces ITRs sur un adénovirus recombinant pour cibler l'intégration d'une séquence d'ADN hétérologue sur le chromosome d'une cellule cible, et améliorer ainsi la stabilité d'expression dans le temps. La demanderesse a en effet montré que ces séquences peuvent être introduites dans le génome d'un adénovirus, qu'elles conservent leur fonctionnalité dans un contexte adénoviral, et 30 qu'elles peuvent être utilisées en thérapie génique ou cellulaire pour intégrer dans des cellules humaines de façon stable une séquence introduite via un adénovirus. De plus, ces virus hybrides de l'invention peuvent être préparés à des titres comparables à ceux de l'adénovirus (très supérieurs à ceux obtenus avec l'AAV), permettant de multiples applications thérapeutiques.

Dans un premier mode de réalisation, la cassette d'intégration selon l'invention ne comporte qu'une seule ITR d'AAV, liée à la séquence d'ADN hétérologue. Il a en effet été montré qu'une seule ITR d'AAV est suffisante pour induire l'intégration de la séquence hétérologue. Dans ce mode de réalisation, l'ITR peut être localisée en aval ou en amont de la séquence d'ADN hétérologue (figures 1a et 1b).

Avantageusement, l'adénovirus selon l'invention comprend une cassette contenant au moins une séquence d'ADN hétérologue bordée de deux ITR d'AAV (figure 1c). Ce mode de réalisation est particulièrement avantageux puisque l'efficacité d'intégration est très importante.

Comme indiqué ci-avant, le génome des AAV comprend 2 ITR, localisées à ses 2 extrémités : une ITR 5' localisée à l'extrémité gauche, et une ITR 3' localisée à l'extrémité droite. La séquence de ces ITR est identique, et elles sont orientées en sens inverse l'une de l'autre. Par ailleurs, dans certains cas, la structure des ITR peut être modifiée par des réarrangements, mais la composition en base n'est pas altérée. Pour la réalisation des vecteurs de l'invention, il est possible d'utiliser indifféremment une ou plusieurs de ces ITRs.

Dans un mode particulièrement avantageux de l'invention, la cassette comprend une séquence d'ADN hétérologue bordée d'une ITR 5' et d'une ITR 3' d'AAV.

Les ITR d'AAV peuvent être obtenues de différentes façons. Elles peuvent tout d'abord être isolées à partir du génome d'un AAV, par les techniques classiques de biologie moléculaire (voir notamment WO91/18088, WO93/09239). Comme indiqué ci-dessus, ces séquences possèdent environ 145 pb, sont localisées aux extrémités du génome de l'AAV, et peuvent être excisées au moyen d'enzymes de restriction appropriées. A cet égard, elles peuvent être isolées à partir des différents sérotypes d'AAV, tels que notamment les AAV1, AAV2, AAV3 et AAV4. Par ailleurs, la séquence des ITR étant connue, elles peuvent aussi être synthétisées artificiellement, au moyen de synthétiseurs d'acides nucléiques, ou obtenues par des techniques mixtes (isolement à partir du génome, puis élongation par des techniques de synthèse). Enfin, ces ITR peuvent également être modifiées par toute technique connue de l'homme du métier (biologie moléculaire, chimie, enzymologie, etc), dans

le but d'améliorer leur fonctionnalité, de réduire leur taille, d'augmenter leur stabilité après intégration ou leur spécificité d'intégration, etc. En particulier, elles peuvent être modifiées par mutation, délétion et/ou addition de paires de bases, selon les techniques classiques de biologie moléculaire.

5 Avantageusement, dans les adénovirus de l'invention, la ou les ITR utilisées sont des ITR d'AAV-2.

Les ITR utilisées dans la présente invention peuvent comprendre uniquement les séquences nécessaires et suffisantes à l'intégration dans le génome des cellules (ITR stricte). Concernant les AAV, les ITR strictes correspondent aux 145 pb situées de part et d'autre du génome (SEQ ID n° 4). Cependant, les ITR utilisées peuvent également comprendre des séquences supplémentaires, par exemple des séquences adjacentes du génome de l'AAV, et/ou des délétions, dans la mesure où ces séquences et/ou délétions ne suppriment pas la capacité d'intégration de la cassette. Ainsi, elles peuvent être isolées sous forme de fragments de longueur plus grande (par exemple 10 jusqu'à 1000 pb), qui peuvent être utilisés tels quels, s'ils ne suppriment pas la capacité d'intégration de la cassette, ou préalablement digérés pour réduire leur taille (voir par exemple SEQ ID n° 1-3 + 5).

Pour déterminer si la ou les séquences choisies peuvent permettre l'intégration dans le chromosome, il est par exemple possible de transfecter une lignée cellulaire humaine (par exemple Hela ou 293) d'une part avec un plasmide portant un gène de sélection de type neoR entre les séquences à tester ou à coté de la séquence à tester et d'autre part avec un plasmide témoin portant le même gène de sélection sans lesdites séquences, de sélectionner des clones par ajout de l'antibiotique G418, puis de comparer entre les deux types de transfections le nombre de clones obtenus. La fréquence d'intégration obtenue avec la ou les séquences test doit être supérieure à celle obtenue par simple sélection, pour que lesdites séquences soient utilisables.

Une autre manière de tester la capacité d'intégration des séquences est de transfecter la même lignée d'une part avec un plasmide portant un gène marqueur (ex. β gal) entre les séquences à tester et d'autre part avec un plasmide témoin portant le même gène marqueur sans lesdites séquences, et de comparer au fur et à mesure des passages l'activité enzymatique entre les deux transfections; l'activité devant diminuer de façon exponentielle dans les transfections témoin et rester plus stable dans l'autre. A cet égard, les cellules "intégrantes" exprimant la β gal peuvent être repérées, après fixation, par coloration Xgal.

Quelle que soit la séquence de l'ITR utilisée, il est particulièrement avantageux qu'elle soit dépourvue de séquence virale codante. En effet, cela permet d'éviter d'introduire dans le génome des cellules des régions virales capables de coder pour tout ou partie de messagers ou protéines viraux, potentiellement toxiques ou immunogènes.

5 Pour la préparation des vecteurs de l'invention, il est donc particulièrement préféré d'utiliser une ou plusieurs ITR dépourvues de séquence virale codante.

Dans les cassettes de l'invention, la séquence d'ADN hétérologue et la ou les ITR doivent être agencées de manière à permettre l'intégration de la cassette dans le 10 génome de la cellule infectée. Elles peuvent être soit directement jointes, soit espacées par des séquences n'altérant pas la propriété d'intégration de la cassette. En particulier, il peut s'agir d'un ou plusieurs sites de restriction, de régions issues d'un plasmide utilisé lors de la construction (exemple : plasmide bactérien), ou de toute région neutre, etc.

15

Comme indiqué ci-avant, les adénovirus de l'invention contiennent une cassette permettant l'intégration d'une séquence d'ADN hétérologue dans le génome de la cellule infectée. La séquence d'ADN hétérologue peut être toute séquence dont le transfert dans une cellule ou un organisme est désirée.

20

De manière avantageuse, la séquence d'ADN hétérologue contient un gène thérapeutique. Au sens de l'invention, on entend par gène thérapeutique notamment tout gène codant pour un produit protéique ayant un effet thérapeutique. Le produit protéique ainsi codé peut être une protéine, un peptide, etc. Ce produit protéique peut être homologue vis-à-vis de la cellule cible (c'est-à-dire un produit qui est normalement exprimé dans la cellule cible lorsque celle-ci ne présente aucune pathologie). Dans ce cas, l'expression d'une protéine permet par exemple de pallier une expression insuffisante dans la cellule ou l'expression d'une protéine inactive ou faiblement active en raison d'une modification, ou encore de surexprimer ladite protéine. Le gène thérapeutique peut aussi coder pour un mutant d'une protéine cellulaire, ayant une stabilité accrue, une activité modifiée, etc. Le produit protéique peut également être hétérologue vis-à-vis de la cellule cible. Dans ce cas, une protéine exprimée peut par exemple compléter ou apporter une activité déficiente dans la cellule, lui permettant de lutter contre une pathologie, ou stimuler une réponse immunitaire.

Parmi les produits thérapeutiques au sens de la présente invention, on peut citer plus particulièrement les enzymes, les dérivés sanguins, les hormones, les lymphokines : interleukines, interférons, TNF, etc (FR 9203120), les facteurs de croissance (érythropoïétine, G-CSF, M-CSF, GM-CSF, etc), les neurotransmetteurs ou leurs précurseurs ou enzymes de synthèse, les facteurs trophiques : BDNF, CNTF, NGF, IGF, GMF, aFGF, bFGF, NT3, NT5, HARP/pléiotrophine, etc; les apolipoprotéines : ApoAI, ApoAIV, ApoE, etc (FR 93 05125), la dystrophine ou une minidystrophine (FR 9111947), la protéine CFTR associée à la mucoviscidose, les gènes suppresseurs de tumeurs : p53, Rb, Rap1A, DCC, k-rev, etc (FR 93 04745), les gènes codant pour des facteurs impliqués dans la coagulation : Facteurs VII, VIII, IX, les gènes intervenant dans la réparation de l'ADN, les gènes suicides (thymidine kinase, cytosine déaminase), etc.

Le gène thérapeutique peut également être un gène ou une séquence antisens, dont l'expression dans la cellule cible permet de contrôler l'expression de gènes ou la transcription d'ARNm cellulaires. De telles séquences peuvent, par exemple, être transcrtes dans la cellule cible en ARN complémentaires d'ARNm cellulaires et bloquer ainsi leur traduction en protéine, selon la technique décrite dans le brevet EP 140 308. Les antisens comprennent également les séquences codant pour des ribozymes, qui sont capables de détruire sélectivement des ARN cibles (EP 321 201).

Le gène thérapeutique peut également comporter une ou plusieurs séquences codant pour un peptide antigénique, capable de générer chez l'homme ou l'animal une réponse immunitaire. Dans ce mode particulier de mise en oeuvre de l'invention, les adénovirus recombinants peuvent être utilisés pour la réalisation soit de vaccins soit de traitements immunothérapeutiques appliqués à l'homme ou à l'animal, notamment contre des microorganismes, des virus ou des cancers. Il peut s'agir notamment de peptides antigéniques spécifiques du virus d'Epstein Barr, du virus HIV, du virus de l'hépatite B (EP 185 573), du virus de la pseudo-rage, ou encore spécifiques de tumeurs (EP 259 212).

En outre, avantageusement, la séquence d'ADN hétérologue peut comporter en plus du gène thérapeutique, un gène marqueur, tel que par exemple le gène de la β -galactosidase ou le gène néo. Les adénovirus de l'invention dans lesquels la cassette

comporte deux gènes (un gène thérapeutique et un gène marqueur notamment) sont particulièrement intéressants car leur construction est largement facilitée.

Préférentiellement, la séquence d'ADN hétérologue comprend également des séquences permettant l'expression du gène thérapeutique dans la cellule ou l'organe désiré. Il peut s'agir des séquences qui sont naturellement responsables de l'expression du gène considéré lorsque ces séquences sont susceptibles de fonctionner dans la cellule infectée. Il peut également s'agir de séquences d'origine différente (responsables de l'expression d'autres protéines, ou même synthétiques). Notamment, il peut s'agir de séquences promotrices de gènes eucaryotes ou viraux. Par exemple, il peut s'agir de séquences promotrices issues du génome de la cellule que l'on désire infecter. De même, il peut s'agir de séquences promotrices issues du génome d'un virus. A cet égard, on peut citer par exemple les promoteurs des gènes E1A, MLP, CMV, LTR-RSV, etc. En outre, ces séquences d'expression peuvent être modifiées par addition de séquences d'activation, de régulation, ou conférant au gène d'intérêt une spécificité d'expression tissulaire.

Par ailleurs, la séquence d'ADN hétérologue peut également comporter une séquence signal dirigeant le produit thérapeutique synthétisé dans les voies de sécrétion de la cellule cible. Cette séquence signal peut être la séquence signal naturelle du produit thérapeutique, mais il peut également s'agir de toute autre séquence signal fonctionnelle, ou d'une séquence signal artificielle.

Les adénovirus recombinants défectifs selon l'invention sont des adénovirus incapables de se répliquer de façon autonome dans la cellule cible. Généralement, le génome des adénovirus défectifs utilisés dans le cadre de la présente invention est donc dépourvu au moins des séquences nécessaires à la réplication dudit virus dans la cellule infectée. Ces régions peuvent être soit éliminées (en tout ou en partie), soit rendues non-fonctionnelles, soit substituées par d'autres séquences et notamment par la cassette. Préférentiellement, le virus défectif conserve néanmoins les séquences de son génome qui sont nécessaires à l'encapsidation des particules virales.

Il existe différents sérotypes d'adénovirus, dont la structure et les propriétés varient quelque peu. Parmi ces sérotypes, on préfère utiliser dans le cadre de la présente invention les adénovirus humains de type 2 ou 5 (Ad 2 ou Ad 5) ou les adénovirus d'origine animale (voir demande WO94/26914). Parmi les adénovirus d'origine animale utilisables dans le cadre de la présente invention on peut citer les adénovirus d'origine canine, bovine, murine, (exemple : Mav1, Beard et al., Virology

75 (1990) 81), ovine, porcine, aviaire ou encore simienne (exemple : SAV). De préférence, l'adénovirus d'origine animale est un adénovirus canin, plus préférentiellement un adénovirus CAV2 [souche manhattan ou A26/61 (ATCC VR-800) par exemple].

5 De préférence, on utilise dans le cadre de l'invention des adénovirus d'origine humaine ou canine ou mixte.

Les adénovirus recombinants défectifs selon l'invention peuvent être préparés par toute technique connue de l'homme du métier (Levrero et al., Gene 101

10 (1991) 195, EP 185 573; Graham, EMBO J. 3 (1984) 2917). En particulier, ils peuvent être préparés par recombinaison homologue entre un adénovirus et un plasmide portant entre autre la cassette. La recombinaison homologue se produit après co-transfection desdits adénovirus et plasmide dans une lignée cellulaire appropriée. La lignée cellulaire utilisée doit de préférence (i) être transformable par 15 lesdits éléments, et (ii), comporter les séquences capables de complémenter la partie du génome de l'adénovirus défectif, de préférence sous forme intégrée pour éviter les risques de recombinaison. A titre d'exemple de lignée, on peut mentionner la lignée de rein embryonnaire humain 293 (Graham et al., J. Gen. Virol. 36 (1977) 59) qui contient notamment, intégrée dans son génome, la partie gauche du génome d'un 20 adénovirus Ad5 (12 %). Des stratégies de construction de vecteurs dérivés des adénovirus ont également été décrites dans les demandes n° WO94/26914 et FR 2,707,664 qui sont incorporées à la présente demande par référence.

Ensuite, les adénovirus qui se sont multipliés sont récupérés et purifiés selon les techniques classiques de biologie moléculaire, comme illustré dans les exemples.

25 Les adénovirus recombinants préparés selon la présente invention peuvent être utilisés pour le transfert de gènes d'intérêt *in vitro*, *ex vivo* ou *in vivo*. *In vitro*, ils peuvent permettre de transférer un gène à une lignée cellulaire, par exemple en vue de produire une protéine recombinante. *Ex vivo*, ils peuvent être utilisés pour 30 transférer un gène sur une population de cellules prélevée à partir d'un organisme, éventuellement sélectionnée et amplifiée, dans le but de conférer à ces cellules des propriétés désirées en vue de leur réadmission à un organisme. *In vivo*, ils peuvent être utilisés pour le transfert de gènes par administration directe d'une solution purifiée, éventuellement associée à un ou plusieurs véhicules pharmaceutiques.

A cet égard, la présente invention concerne également toute composition pharmaceutique comprenant un ou plusieurs adénovirus recombinants déficients tels que décrits précédemment. Ces compositions pharmaceutiques peuvent être formulées en vue d'administrations par voie topique, orale, parentérale, intranasale, 5 intraveineuse, intramusculaire, sous-cutanée, intraoculaire, transdermique, etc. De préférence, les compositions pharmaceutiques de l'invention contiennent un véhicule pharmaceutiquement acceptable pour une formulation injectable. Il peut s'agir en particulier de solutions stériles, isotoniques, ou de compositions sèches, notamment lyophilisées, qui, par addition selon le cas d'eau stérilisée ou de sérum physiologique, 10 permettent la constitution de solutés injectables.

Les doses d'adénovirus recombinant déficient utilisées pour l'injection peuvent être adaptées en fonction de différents paramètres, et notamment en fonction du mode d'administration utilisé, de la pathologie concernée, du gène à exprimer, ou encore de la durée du traitement recherchée. D'une manière générale, les adénovirus 15 recombinants selon l'invention sont formulés et administrés sous forme de doses comprises entre 10^4 et 10^{14} pfu/ml, et de préférence 10^6 à 10^{10} pfu/ml. Le terme pfu ("plaque forming unit") correspond au pouvoir infectieux d'une solution de virus, et est déterminé par infection d'une culture cellulaire appropriée, et mesure, généralement après 48 heures, du nombre de plages de cellules infectées. Les 20 techniques de détermination du titre pfu d'une solution virale sont bien documentées dans la littérature.

La présente invention offre ainsi un moyen très efficace pour le transfert de gènes dans les cellules. Les vecteurs de l'invention peuvent être utilisés dans de nombreuses applications, telles que les maladies génétiques (myopathie, mucoviscidose, SCID, etc), les pathologies du système nerveux central (Alzheimer, Parkinson, etc), les maladies cardiovasculaires (hémophilie, athérosclérose), le SIDA, les cancers, etc.

Les vecteurs de l'invention sont tout particulièrement avantageux pour le transfert de gènes dans les cellules qui se divisent. En effet, grâce aux capacités 30 d'infection du vecteur adénoviral et aux propriétés d'intégration de la cassette, les vecteurs de l'invention permettent de conférer à des cellules qui se divisent des propriétés stables au cours des générations. Des exemples préférés de ces types de cellules sont notamment les cellules hématopoïétiques (cellules souches, progéniteurs, etc), et les cellules cancéreuses. Tout particulièrement, les vecteurs de l'invention peuvent être utilisés pour le transfert de gènes dans les cellules CD34.

A cet égard, l'invention concerne également toute cellule de mammifère modifiée par un adénovirus tel que défini précédemment. Plus préférentiellement, il s'agit d'une cellule humaine, et encore plus préférentiellement, choisie parmi les cellules hématopoïétiques, notamment CD34, ou tumorales.

5

En outre, les vecteurs de l'invention peuvent être utilisés aussi bien pour modifier des cellules humaines que animales (ovins, bovins, animaux domestiques (chiens, chats, etc), chevaux, poissons, etc).

10

L'invention fournit ainsi une méthode particuulièremenr efficace pour l'administration de gènes in vivo, comprenant l'administration d'un vecteur tel que défini ci-avant comprenant une cassette composée d'un gène et d'éléments permettant son intégration dans le génome de tout ou partie des cellules infectées.

15

Les adénovirus de l'invention comprenant une cassette constituée d'une séquence d'ADN hétérologue bordée de 2 ITR d'AAV peuvent également être utilisés pour la production d'AAV recombinants. Les AAV ont en effet besoin pour se répliquer de la présence d'un virus auxiliaire. Il peut s'agir en particulier d'un adénovirus d'un herpès virus ou d'un virus de la vaccine. En l'absence d'un tel virus auxiliaire, les AAV restent sous forme latente dans le génome des cellules infectées, mais ne peuvent se répliquer. Pour cette raison, les AAV recombinants sont généralement produits par co-transfection dans une lignée cellulaire infectée par le virus auxiliaire (notamment l'adénovirus) d'un plasmide portant la cassette AAV (gène bordé des ITR) et d'un plasmide portant les gènes d'encapsidation (plasmide rep/cap). Ce procédé implique trois partenaires = le virus auxiliaire, le plasmide AAV et le plasmide rep/cap. Grâce à la présente invention, ce procédé peut être simplifié à 2 partenaires. En effet, les adénovirus de l'invention jouent à la fois le rôle de virus auxiliaire et de plasmide AAV. Ainsi, une autre application de l'invention réside dans un procédé de préparation d'AAV recombinants selon lequel les cellules productrices sont infectées avec un adénovirus tel que décrit ci-avant et transfectées avec un plasmide portant les gènes rep et cap. Selon une variante de ce procédé, les gènes rep et cap sont également portés par un virus (notamment un adénovirus) utilisé pour co-infecter les cellules productrices. Cette variante est encore plus avantageuse puisqu'elle permet de remplacer l'étape de transfaction du plasmide rep/cap par une infection par un virus rep/cap, beaucoup plus efficace. Toujours selon une variante

préférée de mise en oeuvre, le procédé de l'invention fait appel à une lignée de production contenant, intégrés dans son génome, les gènes rep et cap. Dans cette variante, une seule étape d'infection avec le virus de l'invention est suffisante. Il est également possible d'utiliser un virus selon l'invention contenant, outre la cassette ADN hétérologue/ITR d'AAV, une cassette d'expression des gènes rep et cap. Selon ce mode de réalisation, les gènes rep et cap peuvent être placés sous le contrôle d'un promoteur fort et/ou inductible. Avantageusement, l'adénovirus est délesté de l'ensemble des gènes viraux à l'exception de la région E4, et il est co-infecté avec un autre adénovirus portant l'ensemble du génome à l'exception de la région E4, dans les cellules 293. Ce mode de mise en oeuvre est particulièrement avantageux. En effet, le virus E4 utilisé est le même pour tous les ADN hétérologues. De plus, la construction du virus passe par l'intermédiaire d'un plasmide portant E4, la séquence PSI et les ITR de l'adénovirus (plasmide pE4ITR, cf FR 2,707,664), facilement manipulable, dans lequel sont introduits les gènes rep et cap et l'ADN hétérologue encadré des ITR d'AAV. Cette stratégie permet ainsi de propager les 2 virus à toutes les cellules, contrairement à la transfection d'un plasmide rep- cap qui ne touche qu'une fraction de la population cellulaire et ne donne donc que des titres peu élevés d'AAV.

La présente invention sera plus complètement décrite à l'aide des exemples qui suivent, qui doivent être considérés comme illustratifs et non limitatifs.

20 Légende des figures

Figure 1 : Représentation schématique des cassettes selon l'invention.

Figure 2 : Représentation du vecteur pXL2373

Figure 3 : Construction du vecteur pXL2373

Figure 4 : Représentation du vecteur pXL2384

25 Figure 5 : Construction du vecteur M13 ITR FL

Figure 6 : Représentation du vecteur pITRFL

Figure 7 : Représentation du vecteur pXL2388

Figure 8 : Représentation du vecteur pXL2389

Figure 9 : Représentation du vecteur papoAI ITRAAV

30 Techniques générales de biologie moléculaire

Les méthodes classiquement utilisées en biologie moléculaire telles que les extractions préparatives d'ADN plasmidique, la centrifugation d'ADN plasmidique en gradient de chlorure de césum, l'électrophorèse sur gels d'agarose ou d'acrylamide, la

phénol ou au phénol-chloroforme, la précipitation d'ADN en milieu salin par de l'éthanol ou de l'isopropanol, la transformation dans *Escherichia coli*, etc ... sont bien connues de l'homme de métier et sont abondamment décrites dans la littérature [Maniatis T. et al., "Molecular Cloning, a Laboratory Manual", Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, N.Y., 1982; Ausubel F.M. et al. (eds), "Current Protocols in Molecular Biology", John Wiley & Sons, New York, 1987].

Les plasmides de type pBR322, pUC et les phages de la série M13 sont d'origine commerciale (Bethesda Research Laboratories).

Pour les ligatures, les fragments d'ADN peuvent être séparés selon leur taille par électrophorèse en gels d'agarose ou d'acrylamide, extraits au phénol ou par un mélange phénol/chloroforme, précipités à l'éthanol puis incubés en présence de l'ADN ligase du phage T4 (Biolabs) selon les recommandations du fournisseur.

Le remplissage des extrémités 5' proéminentes peut être effectué par le fragment de Klenow de l'ADN Polymérase I d'*E. coli* (Biolabs) selon les spécifications du fournisseur. La destruction des extrémités 3' proéminentes est effectuée en présence de l'ADN Polymérase du phage T4 (Biolabs) utilisée selon les recommandations du fabricant. La destruction des extrémités 5' proéminentes est effectuée par un traitement ménagé par la nuclease S1.

La mutagénèse dirigée *in vitro* par oligodéoxynucléotides synthétiques peut être effectuée selon la méthode développée par Taylor et al. [Nucleic Acids Res. 13 (1985) 8749-8764] en utilisant le kit distribué par Amersham.

L'amplification enzymatique de fragments d'ADN par la technique dite de PCR [Polymérase-catalyzed Chain Reaction, Saiki R.K. et al., Science 230 (1985) 1350-1354; Mullis K.B. et Faloona F.A., Meth. Enzym. 155 (1987) 335-350] peut être effectuée en utilisant un "DNA thermal cycler" (Perkin Elmer Cetus) selon les spécifications du fabricant.

La vérification des séquences nucléotidiques peut être effectuée par la méthode développée par Sanger et al. [Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 74 (1977) 5463-5467] en utilisant le kit distribué par Amersham.

30 Exemples

Exemple 1 : Construction d'un plasmide portant le gène de la β -galactosidase inséré entre les ITRs de l'AAV2.

Cet exemple décrit la construction d'un vecteur, désigné pXL2373, portant 2 régions ITRs encadrant un gène marqueur (β gal) et un site de polyadénylation, servant d'intermédiaire pour la préparation, par recombinaison, d'un adénovirus recombinant.

5

Le plasmide pXL2373 (figure 2) contient notamment un fragment comprenant
- le LTR ("long terminal repeat") du virus du sarcome de Rous (RSV),
- le gène lacZ d'Escherichia coli avec les séquences de localisation nucléaire,
et,
10 - les signaux de polyadénylation de la région précoce de SV40,

lequel fragment étant inséré entre deux séquences ITRs tronquées de l'AAV2. La séquence des ITR utilisées est représentée sur les SEQ ID n° 1 et 2.

Le vecteur pXL2373 contient également une région d'adénovirus permettant la recombinaison homologue.

15

Le vecteur pXL2373 a été construit de la manière suivante (figure 3) : Le fragment d'ADN portant le LTR ("long terminal repeat") du virus du sarcome de Rous (RSV), le gène lacZ d'Escherichia coli avec les séquences de localisation nucléaire et les signaux de polyadénylation de la région précoce de SV40 a été isolé sous forme d'un fragment XbaI-KpnI à partir du plasmide pRSV- β gal (Stratford-Perricaudet et al., J.Clin.Invest.90 (1992) 626). Ce fragment a ensuite été inséré aux sites correspondant du plasmide pAICMVIXCAT.3 (Philip et al., Molecular and Cellular Biology, sous presse). Cette étape permet d'insérer ce fragment entre les 650 premières et les 191 dernières paires de bases (pb) de l'AAV2. Le plasmide résultant a été appelé pXL2359 (figure 3a).

25

Le fragment XbaI-BglIII de pXL2359, comportant le LTR du virus du sarcome de Rous (RSV), le gène lacZ d'Escherichia coli avec les séquences de localisation nucléaire et les signaux de polyadénylation de la région précoce de SV40, ainsi que les 191 dernières pb de l'AAV, a été inséré aux sites correspondants de PBS KS+, pour générer le plasmide pXL2360. Ce sous-clonage permet d'isoler ce même fragment sous forme d'un fragment XbaI-SmaI. Le fragment XbaI-SmaI de pXL2360 a ensuite été inséré aux sites XbaI-EcoRV compatibles de pRSV- β gal pour donner le vecteur pXL2364 (figure 3a).

30

Le plasmide psub201 a été décrit dans Samulski et al. (J. Virol 61 (1987) 3096). Le fragment XbaI-PvuII de ce plasmide portant les séquences 4484 à 4675 de

l'AAV a été inséré aux sites XbaI-EcoRV de pCRII (Invitrogen) pour générer le plasmide pXL2362. Enfin le fragment SpeI-XbaI de pXL2362 a été introduit au site compatible XbaI de pXL2364 (figure 3b).

5 Le plasmide obtenu a été désigné pXL2373 (figure 2). La capacité de ce vecteur à permettre l'intégration de la cassette est vérifiée par transfection dans les lignées cellulaires Hela et 293.

Exemple 2 : Construction d'un plasmide portant le gène de la β -galactosidase inséré entre les ITRs de l'AAV2.

10 Cet exemple décrit la construction d'un vecteur, désigné pXL2384, portant 2 régions ITRs encadrant un gène marqueur (β gal) et un site de polyadénylation, servant d'intermédiaire pour la préparation, par recombinaison, d'un adénovirus recombinant.

15 Le plasmide pXL2384 (figure 4) contient notamment un fragment comprenant
- le LTR ("long terminal repeat") du virus du sarcome de Rous (RSV),
- le gène lacZ d'Escherichia coli avec les séquences de localisation nucléaire,
et,
20 - les signaux de polyadénylation de la région précoce de SV40,
lequel fragment étant inséré entre deux séquences ITRs de l'AAV2. La séquence des ITR utilisées est représentée sur les SEQ ID n° 2 et 3.

Le vecteur pXL2384 contient également une région d'adénovirus permettant la recombinaison homologue.

25 Le vecteur pXL2384 a été obtenu en insérant les fragments
- EcoRV-XbaI de pRSV β gal portant la partie de la protéine IX de l'Ad5 servant à la recombinaison, et,
30 - EcoRV-KpnI de pXL2360 (exemple 1) portant la région 3' du gène lacZ à partir du site EcoRV, les signaux de polyadénylation de la région précoce de SV40, la région ITR de l'AAV plus les 47 pdb situées en amont de l'ITR gauche de l'AAV2, aux sites XbaI-KpnI de pXL2373 (exemple 1).

Une carte de ce vecteur est donnée sur la figure 4. La capacité de ce vecteur à permettre l'intégration de la cassette est vérifiée par transfection dans les lignées cellulaires Hela et 293.

Exemple 3 : Construction d'un plasmide portant le gène de la β -galactosidase inséré entre les ITRs strictes de l'AAV2.

5 Dans les plasmides décrits ci-avant, les séquences ITRs utilisées comportent une extension de 46 pb en aval de l'ITR gauche ou en amont de l'ITR droite, et/ou une délétion de 9 pb en 5' de l'ITR gauche (voir SEQ ID n° 1-3). Cet exemple décrit la construction d'un plasmide comportant un gène d'intérêt inséré entre les ITRs strictes de l'AAV2. Plus particulièrement, cet exemple décrit la construction d'un vecteur, désigné pITRFL, portant 2 régions ITRs strictes encadrant un gène marqueur (β gal) et un site de polyadénylation, servant d'intermédiaire pour la préparation, par recombinaison, d'un adénovirus recombinant.

15 Le plasmide pITRFL (figure 6) contient notamment un fragment comprenant
- le LTR ("long terminal repeat") du virus du sarcome de Rous (RSV),
- le gène lacZ d'Escherichia coli avec les séquences de localisation nucléaire,
et,
- les signaux de polyadénylation de la région précoce de SV40,
lequel fragment étant inséré entre deux séquences ITRs strictes de l'AAV2. La
20 séquence des ITR utilisées est représentée sur la SEQ ID n° 4.

Le vecteur pITRFL contient également une région d'adénovirus permettant la recombinaison homologue.

25 Le vecteur pITRFL a été construit de la façon suivante : La séquence ITR
stricte a été construite au moyen des oligodéoxynucléotides suivants :

seq 4259: (SEQ ID n°6)

5' CTA GAT TGG CCA CTC CCT CTC TGC GCG CTC GCT CGC TCA
CTG AGG CCG GGC GAC CAA AGG TCG CCC GAC GCC A 3'
seq 4260: (SEQ ID n°7)

30 5' AGC TTG GCG TCG GGC GAC CTT TGG TCG CCC GGC CTC AGT
GAG CGA GCG AGC GCG CAG AGA GGG AGT GGC CAA 3' T
seq 4560: (SEQ ID n°8)

5' AGC TTG ACG CCC GGG CTT TGC CCG GGC GGC CTC AGT GAG
CGA GCG A 3'

seq 4561: (SEQ ID n°9)

5' GCG CGC TCG CTC GCT CAC TGA GGC CGC CGC CCG GGC AAA GCC
CGG GCG TCA 3'

seq 4263: (SEQ ID n°10)

5' GCG CGC AGA GAG GGA GTG GCC AAC TCC ATC ACT AGG GGT
TCC TAC TAG TG 3'

seq 4264: (SEQ ID n°11)

5' GAT CCA CTA GTA GGA ACC CCT AGT GAT GGA GTT GCC CAC
TCC CTC TCT 3'

10 Les oligodéoxynucléotides seq 4259 et seq 4260 sont hybridés et forment à leurs extrémités un demi-site *Xba*I et un demi-site *Hind*III (figure 5). Ces oligodéoxynucléotides sont ensuite introduits entre les sites correspondant de M13mp18, et le bactériophage obtenu est appelé M13ITR5' (figure 5). Les oligodéoxynucléotides seq 4560 et seq 4561 d'une part et seq 4263 et seq 4264 d'autre part sont hybridés deux à deux et introduits entre les sites *Hind*III et *Bam*HI de M13mp18, le bactériophage obtenu est appelé M13ITR3'. Le fragment *Kpn*I-*Aha*II de M13ITR5' comportant la région 5' de l'ITR d'AAV jusqu'au site *Aha*II (région 1 à 63 sur la séquence de l'AAV) et le fragment *Aha*II-*Bam*HI comportant la région 3' de l'ITR (région 64 à 145) sont introduits aux sites *Kpn*I-*Bam*HI de M13mp18 pour donner le vecteur M13 "ITRFL".

Le fragment *Bam*HI-*Spe*I de M13 "ITRFL" contenant la séquence entière de l'ITR de l'AAV (bases 1 à 145) est introduite entre les sites uniques *Bgl*III-*Spe*I de pXL2384 pour donner le plasmide pRSV8gal ITR1ss.

Enfin les fragments *Kpn*I-*Hinc*IIde M13 "ITRFL" contenant la séquence entière de l'ITR de l'AAV (bases 1 à 145) et *Eco*RV-*Xho*I de pXL2384 portant la protéine IX de Ad5 sont introduits entre les sites compatibles *Xho*I-*Kpn*I de pRSV8galITR1ss pour donner pITRFL (figure 6).

30 Exemple 4 : Construction d'un plasmide portant le gène de la β -galactosidase et le gène néoR insérés entre les ITRs de l'AAV2.

Cet exemple décrit la construction d'un vecteur, désigné pXL2388, portant 2 régions ITRs encadrant 2 gènes (β gal et néoR) et un site de polyadénylation, servant d'intermédiaire pour la préparation, par recombinaison, d'un adénovirus recombinant.

Le plasmide pXL2388 (figure 7) contient notamment un fragment comprenant :

- le gène conférant la résistance à la néomycine (néoR) sous le contrôle du promoteur SV40, suivi des signaux de polyadénylation du virus SV40,
- 5 - le LTR ("long terminal repeat") du virus du sarcome de Rous (RSV),
- le gène lacZ d'Escherichia coli avec les séquences de localisation nucléaire, et,
- les signaux de polyadénylation de la région précoce de SV40,

lequel fragment étant inséré entre deux séquences ITRs de l'AAV2 (séquences 10 représentées sur les SEQ ID n° 2 et 3).

Le vecteur pXL2388 contient également une région d'adénovirus permettant la recombinaison homologue.

Le vecteur pXL2388 a été construit de la manière suivante : Le fragment 15 d'ADN portant le gène conférant la résistance à la néomycine (néoR) sous le contrôle du promoteur SV40, ainsi que les signaux de polyadénylation du virus SV40 a été isolé sous forme d'un fragment BamHII à partir du plasmide pMAMneoluc (Clontech). Ce fragment a ensuite été introduit au site BamHII du plasmide pBS KS+ (Stratagene) pour introduire des sites de restriction nouveaux de part et d'autre de ce fragment. Le 20 plasmide ainsi obtenu est appelé pXL2363.

Le fragment d'ADN portant le gène conférant la résistance à la néomycine (néoR) sous le contrôle du promoteur SV40, ainsi que les signaux de polyadénylation du virus SV40 a ensuite été isolé à partir de pXL2363 sous forme d'un fragment EcoRI-XbaI et introduit aux sites EcoRI-XbaI de pCRII (Invitrogen) pour donner 25 naissance au plasmide pXL2372.

Le fragment d'ADN portant le gène conférant la résistance à la néomycine (néoR) sous le contrôle du promoteur SV40, ainsi que les signaux de polyadénylation du virus SV40 a ensuite été isolé sous forme d'un fragment SpeI à partir de pXL2372, et introduit au site SpeI de pXL2384 (exemple 2) pour donner naissance au plasmide 30 pXL2388 (figure 7). Un plasmide témoin, pXL2429, portant le gène de résistance à la néomycine sous le contrôle du promoteur SV40 et le gène lacZnls sous le contrôle du promoteur RSV insérés entre les séquences de l'adénovirus, mais dépourvu des séquences ITR de l'AAV a également été construit. La séquence du gène de résistance à la néomycine sous le contrôle du promoteur SV40 provient du plasmide pXL2388.

digéré par SpeI, et ce fragment a été inséré au site SpeI de pRSVGAIIX pour donner pXL2429.

La capacité de ce vecteur à permettre l'intégration de la cassette est vérifiée par 5 transfaction dans les lignées cellulaires Hela et 293. Les cellules 293 (2 106 cellules cultivées en boites de 100 mm) sont transfectées avec les plasmides pXL2388, pXL2429 selon la technique au phosphate de calcium. Le lendemain de la transfection le milieu est changé. Après 72 heures les cellules sont récoltées et remises en culture après dilution au 1/10 et au 1/50 dans un milieu non sélectif. 72 heures après, le milieu 10 est changé et on applique un milieu sélectif contenant de la génétidine à 400 microg/ml. Des clones apparaissent après environ 2 semaines de culture dans ce milieu et on constate que la fréquence d'apparition des clones est 100 fois plus élevée avec le plasmide pXL2388 qu'avec le plasmide pXL2429 ce qui témoigne de la capacité des ITRs à intégrer le transgène dans le génome de la cellule.

15

Exemple 5 : Construction d'un plasmide portant un gène de fusion Sh ble::lacZ inséré entre les ITRs de l'AAV2.

Cet exemple décrit la construction d'un vecteur, désigné pXL2389, portant 20 2 régions ITRs encadrant 1 gène de fusion (Sh ble::lacZ), servant d'intermédiaire pour la préparation, par recombinaison, d'un adénovirus recombinant.

25 Le plasmide pXL2389 (figure 8) contient notamment un fragment portant, sous le contrôle du promoteur SV40, une fusion entre le gène de la résistance à la Phléomycine (ou à la zéomycine) et le gène reporter lacZ, suivie des signaux de polyadénylation du virus SV40, lequel fragment étant inséré entre les séquences de deux ITRs de l'AAV (séquences représentées sur les SEQ ID n° 2 et 3).

Le vecteur pXL2389 contient également une région d'adénovirus permettant la 30 recombinaison homologue. La fusion portant un marqueur dominant (Sh ble) et le gène reporter lacZ permet d'obtenir un phénotype dominant associé à un phénotype rapidement identifiable (coloration bleue sur X-gal) avec une taille qui n'excède pas 3.5 kb. De ce fait la région insérée entre les deux ITRs de l'AAV a une taille qui n'excède pas 4.3 kb.

Le vecteur pXL2389 a été construit de la façon suivante : Le fragment SpeI-NdeI du plasmide pUT593 (Cayla, Toulouse) portant le promoteur SV40 et le début de la fusion Sh ble::lacZ a été isolé, puis inséré entre les sites SpeI-NdeI de pXL2384 (exemple 2). Le plasmide ainsi obtenu a été désigné pXL2389 (figure 8). La capacité 5 de ce vecteur à permettre l'intégration de la cassette est vérifiée par transfection dans les lignées cellulaires Hela et 293.

Exemple 6 : Construction d'un plasmide portant le gène de l'apolipoprotéine AI inséré entre les ITRs de l'AAV2.

10

L'apolipoprotéine AI est une protéine constituée de 243 acides aminés, synthétisée sous la forme d'une prépropeptide de 267 résidus, ayant une masse moléculaire de 28.000 daltons. Elle est synthétisée chez l'homme spécifiquement dans le foie et l'intestin et elle constitue la protéine essentielle des particules HDL (70% de leur masse en protéines). Elle est abondante dans le plasma (1.0-1.2 g/l). Son activité la mieux caractérisée sur le plan biochimique est l'activation de la lécithine-cholestérol acyl-transférase (LCAT), mais de nombreuses autres activités lui sont attribuées, comme notamment la stimulation de l'efflux de cholestérol cellulaire. Le rôle physiologique de l'apolipoprotéine AI semble contrebalancé par l'apolipoprotéine AII puisque chez l'homme, le rapport des deux concentrations plasmatiques (AII/AI) est très étroitement corrélé avec le risque coronarien. L'apolipoprotéine AI joue un rôle majeur dans la résistance à l'athérosclérose, probablement lié au transport inverse du cholestérol, puisque la seule expression de cette apolipoprotéine dans des souris transgéniques permet de réduire de 40 fois la 15 surface des dépôts lipidiques au niveau de l'aorte par rapport à des souris contrôles (Rubin et al. 1993 Science, In Press). Son gène, long de 1863 bp, a été cloné et 20 séquencé (Sharpe et al., Nucleic Acids Res. 12(9) (1984) 3917). Par ailleurs, 25 différents variants naturels de l'apoAI ont décrits dans l'art antérieur.

Les plasmides utilisés pour générer, par recombinaison homologue, les 30 adénovirus recombinants exprimant le gène de l'apoAI ont été construits comme suit :

Construction du plasmide papoAI ITR AAV (figure 9) :

Le plasmide papoAI ITR AAV contient notamment l'ADNc codant pour la préproapoAI sous le contrôle du promoteur RSV, les signaux de polyadénylation du virus SV40, le tout inséré entre les ITRs de l'AAV, ainsi qu'une région d'adénovirus 35 permettant la recombinaison homologue. Il a été construit de la manière suivante : Le

fragment d'ADN portant notamment l'ITR gauche et la séquence d'encapsidation de l'adenovirus 5 ainsi que le LTR du virus RSV a été isolé sous forme d'un fragment XmnI-ClaI du plasmide pXL2384 (exemple 2) et le fragment d'ADN portant l'ADNc codant pour la préproapoAI et les signaux de polyadénylation du virus SV40 a été isolé sous forme d'un fragment ClaI-BamHI à partir du plasmide pXL2244 (FR93 05125). Ces deux fragments ont ensuite été insérés aux sites XmnI-BamHI du plasmide pXL2384, pour générer le plasmide papoAI ITR AAV. Lors de cette dernière étape, la région lacZ suivie du polyA de SV40 a été éliminée.

La capacité de ce vecteur à permettre l'intégration de la cassette est vérifiée 10 par transfection dans les lignées cellulaires Hela et 293.

Exemple 7 : Construction du plasmide pXL2629.

Cet exemple décrit la construction d'un vecteur pXL2629 portant 2 régions 15 ITRs encadrant le gène marqueur lacZ et un site de polyadénylation, servant d'intermédiaire pour la préparation par recombinaison d'un adénovirus recombinant. Ce plasmide diffère du plasmide pXL2384 par la séquence de l'ITR AAV gauche (SEQ ID n°5). Le plasmide pXL2359 (exemple 1) a été digéré par Hinfl dont l'extrémité a été rendue franche par un traitement par l'ADN polymérase du bactériophage T4 puis redigéré par PstI, un fragment d'environ 200 pb portant l'ITR 20 de l'AAV (séquence figure) a été isolé et introduit dans le plasmide pBSKS+ aux sites PstI et SmaI (extrémité franche). Le plasmide ainsi construit est pXL2580. Le plasmide pXL2581 est dérivé de pXL2384 par insertion de 2 oligonucléotides seq 4674 et seq 4675 aux sites BgIII-Spel de pXL2384, ce plasmide porte donc à la 25 place de l'ITR de l'AAV gauche de pXL2384 un site unique BstBI qui pourrait être utilisé pour construire des adénovirus recombinants AdITRsAAVRSVBgal par la technique de transfection d'un mélange de ligation de deux plasmides linéarisés dans les cellules 293.

seq4674 : 5'GATCTTCGAAT3' (SEQ ID n°12)
30 seq 4675 : 5'CTAGATTCGAAA3' (SEQ ID n°13)

Le plasmide pXL2629 a été construit de la façon suivante : le plasmide pXL2580 a été digéré par BamHI-BglII et le fragment d'environ 170 pb contenant la séquence complète de l'ITR de l'AAV a été introduit dans le plasmide pXL2581 35 préalablement linéarisé par BglII.

Exemple 8 : Préparation de l'adénovirus Ad ITRsAAVRSV β Gal

Cet exemple décrit la construction d'un adénovirus recombinant défectif comportant une cassette permettant l'intégration d'un gène dans le génome des cellules. Plus particulièrement, cet adénovirus, désigné Ad ITRsAAVRSV β Gal comporte une cassette composée de 2 ITR d'AAV entourant le gène β gal. Cet adénovirus a été obtenu par cotransfection du plasmide pXL2384 pour la recombinaison avec un vecteur adénoviral déficient, dans les cellules helper (lignée 293) apportant en trans les fonctions codées par les régions E1 (E1A et E1B) d'adénovirus.

Plus précisément, l'adénovirus Ad ITRsAAVRSV β gal a été préparé par recombinaison homologue *in vivo* entre l'adénovirus AdRSV β Gal (Stratford-Perricaudet et al., *J.Clin.Invest.* 90 (1992) 626) et le plasmide pXL2384, selon le protocole suivant : Le plasmide pXL2384 linéarisé par l'enzyme *XmnI* et l'adénovirus AdRSV β Gal linéarisé par *Clal* sont cotransférés dans la lignée 293 en présence de phosphate de calcium pour permettre la recombinaison. Les adénovirus recombinants ainsi générés sont sélectionnés par purification sur plaque. Après isolement, l'adénovirus recombinant est amplifié dans la lignée cellulaire 293, ce qui conduit à un surmajeant de culture contenant l'adénovirus défectif recombinant non purifié ayant un titre d'environ 10^{10} pfu/ml. Pour la purification, les particules virales sont centrifugées sur gradient de chlorure de césum selon les techniques connues (voir notamment Graham et al., *Virology* 52 (1973) 456).

L'adénovirus Ad ITRsAAVRSV β gal est conservé à -80°C dans 20% de glycérol.

Exemple 9 : Préparation de l'adénovirus Ad Δ ITRsAAVRSV β gal.

Cet exemple décrit la construction d'un adénovirus recombinant défectif comportant une cassette permettant l'intégration d'un gène dans le génome des cellules. Plus particulièrement, cet adénovirus, désigné Ad Δ ITRsAAVRSV β Gal comporte une cassette composée de 2 ITR d'AAV tronquées entourant le gène β gal. Cet adénovirus a été obtenu par cotransfection du plasmide pXL2373 pour la recombinaison avec un vecteur adénoviral déficient, dans les cellules helper (lignée 293) apportant en trans les fonctions codées par les régions E1 (E1A et E1B) d'adénovirus.

Le protocole utilisé est le même que celui décrit dans l'exemple 7 pour la préparation de l'adénovirus Ad ITRsAAVRSV β gal. L'adénovirus Ad ΔITRsAAVRSV β gal est conservé à -80°C dans 20% de glycérol.

5 Exemple 10 : Préparation de l'adénovirus Ad ITRFL.

Cet exemple décrit la construction d'un adénovirus recombinant défectif comportant une cassette permettant l'intégration d'un gène dans le génome des cellules. Plus particulièrement, cet adénovirus, désigné Ad ITRFL comporte une cassette composée de 2 ITR strictes d'AAV entourant le gène β gal. Cet adénovirus a été obtenu par cotransfection du plasmide pITRFL pour la recombinaison avec un vecteur adénoviral déficient, dans les cellules helper (lignée 293) apportant en trans les fonctions codées par les régions E1 (E1A et E1B) d'adénovirus.

Le protocole utilisé est le même que celui décrit dans l'exemple 7 pour la 15 préparation de l'adénovirus Ad ITRsAAVRSV β gal. L'adénovirus Ad ITRFL est conservé à -80°C dans 20% de glycérol.

Exemple 11 : Préparation de l'adénovirus Ad apoAI ITAAV.

20 Cet exemple décrit la construction d'un adénovirus recombinant défectif comportant une cassette permettant l'intégration d'un gène dans le génome des cellules. Plus particulièrement, cet adénovirus, désigné Ad apoAI ITAAV comporte une cassette composée de 2 ITR d'AAV tronquées entourant le gène de la préproapoAI. Cet adénovirus a été obtenu par cotransfection du plasmide papoAI 25 ITR AAV pour la recombinaison avec un vecteur adénoviral déficient, dans les cellules helper (lignée 293) apportant en trans les fonctions codées par les régions E1 (E1A et E1B) d'adénovirus.

Le protocole utilisé est le même que celui décrit dans l'exemple 8 pour la 30 préparation de l'adénovirus Ad ITRsAAVRSV β gal. L'adénovirus Ad apoAI ITAAV est conservé à -80°C dans 20% de glycérol.

Exemple 12 : Préparation de l'adénovirus Ad2629.

Cet exemple décrit la construction d'un adénovirus recombinant Ad2629 portant une cassette composée de 2 ITRs d'AAV entourant le gène Bgal. Cet adénovirus a été obtenu par cotransfection du plasmide pXL2629 avec un vecteur adénoviral déficient, dans les cellules helper (lignée 293) apportant en trans les fonctions codées par les régions E1 (E1A et E1B) d'adénovirus.

Plus précisément les adénovirus Ad2629 ont été préparés par recombinaison homologue *in vivo* entre l'adénovirus d1324 et le plasmide pXL2629 selon le protocole suivant : le plasmide pXL2629 linéarisé par XmnI et l'adénovirus d1324 linéarisé par ClaI sont cotransfектés dans la lignée 293 en présence de phosphate de calcium pour permettre la recombinaison. Les adénovirus recombinants ainsi générés sont sélectionnés par purification sur plaque. Après isolement, l'adénovirus recombinant est amplifié dans la lignée cellulaire 293, ce qui conduit à un surnageant de culture contenant l'adénovirus défectif recombinant non purifié ayant un titre d'environ 109-1010 pfu/ml. Pour la purification, les particules virales sont centrifugées sur gradient de chlorure de césum selon les techniques connues (voir notamment Graham et al., *Virology* 52 (1973)456).

LISTE DE SEQUENCES

(1) INFORMATION GENERALE:

5 (i) DEPOSANT:
 (A) NOM: RHONE-POULENC RORER S.A.
 (B) RUE: 20, avenue Raymond ARON
 (C) VILLE: ANTONY
 (E) PAYS: FRANCE
 (F) CODE POSTAL: 92165

10 (ii) TITRE DE L' INVENTION: : VIRUS RECOMBINANTS, LEUR PREPARATION
 ET LEUR UTILISATION THERAPEUTIQUE.

(iii) NOMBRE DE SEQUENCES: 13

15 (iv) FORME LISIBLE PAR ORDINATEUR:
 (A) TYPE DE SUPPORT: Tape
 (B) ORDINATEUR: IBM PC compatible
 (C) SYSTEME D'EXPLOITATION: PC-DOS/MS-DOS
 (D) LOGICIEL: PatentIn Release #1.0, Version #1.25 (OEB)

(2) INFORMATION POUR LA SEQ ID NO: 1:

20 (i) CARACTERISTIQUES DE LA SEQUENCE:
 (A) LONGUEUR: 135 paires de bases
 (B) TYPE: acide nucléique
 (C) NOMBRE DE BRINS: double
 (D) CONFIGURATION: linéaire

(ii) TYPE DE MOLECULE: ADNC

25 (ix) CARACTERISTIQUE :
 (D) AUTRE INFORMATION: /product= Séquence ITR droite sur
 pXL2373

(xi) DESCRIPTION DE LA SEQUENCE: SEQ ID NO: 1:

CCATGGCTAC GTAGATAAGT AGCATGGCGG GTTAATCATT AACTACAAAGG AACCCCTACT 60
 30 GATGGAGTTG GCCACTCCCT CTCTGCGCGC TCGCTCGCTC ACTGAGGCCG GGCGACCAA 120
 GGTCGCCCCGA CGCCC 135

(2) INFORMATION POUR LA SEQ ID NO: 2:

35 (i) CARACTERISTIQUES DE LA SEQUENCE:
 (A) LONGUEUR: 174 paires de bases
 (B) TYPE: acide nucléique
 (C) NOMBRE DE BRINS: double
 (D) CONFIGURATION: linéaire

(ii) TYPE DE MOLECULE: ADNC

40 (ix) CARACTERISTIQUE :
 (D) AUTRE INFORMATION: /product= Séquence ITR gauche sur
 pXL2384 et sur pXL2373

(xi) DESCRIPTION DE LA SEQUENCE: SEQ ID NO: 2:

GGCGCTCGC TCGCTCACTG AGGCCGCCCG GGCAAAGCCC GGCGCTCGGG CGACCTTTGG 60

TCGGCCGGCC	TCAGTGAGCG	AGCGAGCGCG	CAGAGAGGGA	GTGGCCAAGT	CCATCACTAG	120
GGGTTCCCTG	TAGTTANTGA	TTAACCCGCC	ATGCTACTTA	TCTACGTAGC	CATG	174

(2) INFORMATION POUR LA SEQ ID NO: 3:

5 (i) CARACTERISTIQUES DE LA SEQUENCE:
 (A) LONGUEUR: 192 paires de bases
 (B) TYPE: acide nucléique
 (C) NOMBRE DE BRINS: double
 (D) CONFIGURATION: linéaire

10 (ii) TYPE DE MOLECULE: ADNC
 (ix) CARACTERISTIQUE :
 (D) AUTRE INFORMATION: /product= Séquence ITR droite sur pXL2384

(xi) DESCRIPTION DE LA SEQUENCE: SEQ ID NO: 3:

15 CCATGGCTAC	GTAGATAAGT	AGCATGGCGG	GTTAACTCATT	AACTACAAGG	AACCCCTAGT	60
GATGGAGTTG	GCCACTCCCT	CTCTGCGCGC	TGCGCTCGCTC	ACTGAGGCCG	GGCGACCAAA	120
GGTGGCCCGA	CGCCCGGGCT	TTGGCCGGGC	GGCCCTAGTG	ACCGAGCGAG	CGCCCAAGAGA	180
GGGACTGGCC	AA					192

20 (2) INFORMATION POUR LA SEQ ID NO: 4:

(i) CARACTERISTIQUES DE LA SEQUENCE:
 (A) LONGUEUR: 145 paires de bases
 (B) TYPE: acide nucléique
 (C) NOMBRE DE BRINS: double
 (D) CONFIGURATION: linéaire

(ii) TYPE DE MOLECULE: ADNC
 (ix) CARACTERISTIQUE :
 (D) AUTRE INFORMATION: /product= Séquence ITR stricte

(xi) DESCRIPTION DE LA SEQUENCE: SEQ ID NO: 4:

30 TTGGCCACTC	CCTCTCTGGC	CGCTCGCTCG	CTCACTGAGG	CCGGGCGACC	AAAGGTCGCC	60
CGACGGCCCG	GCTTTGCCCG	GGCCGCTCA	GTGAGCGAGC	GAGGCGCAG	AGAGGGAGTG	120
GCCAACTCCA	TCACTAGGGG	TTCCT				145

(2) INFORMATION POUR LA SEQ ID NO: 5:

35 (i) CARACTERISTIQUES DE LA SEQUENCE:
 (A) LONGUEUR: 194 paires de bases
 (B) TYPE: acide nucléique
 (C) NOMBRE DE BRINS: double
 (D) CONFIGURATION: linéaire

40 (ii) TYPE DE MOLECULE: ADNC
 (ix) CARACTERISTIQUE :
 (D) AUTRE INFORMATION: /product= ITR AAV gauche de pXL2629

(xi) DESCRIPTION DE LA SEQUENCE: SEQ ID NO: 5:

AGATCTGGGC CACTCCCTCT	CTGGCGCTC	GCTCGCTCAC	TGAGGCCGGG	CGACCAAAGG	60
TCGCCCCGACG	CCCGGGCTTT	CCCCGGGG	CCTCAGTGAG	CGAGCGAGGG	120
GACTGGCAAC	TCCATCACTA	GGGGTCCCTG	GAGGGGTGGA	GGGGGGATCC	180
5 GAACTAGTGG	ATCC				194

(21) INFORMATION POUR LA SEQ ID NO: 6:

(i) CARACTERISTIQUES DE LA SEQUENCE:

- (A) LONGUEUR: 73 paires de bases
- (B) TYPE: acide nucléique
- (C) NOMBRE DE BRINS: double
- (D) CONFIGURATION: linéaire

(ii) TYPE DE MOLECULE: ADNC

(ix) CARACTERISTIQUE :

- (D) AUTRE INFORMATION: /product= Seq 4259

(xi) DESCRIPTION DE LA SEQUENCE: SEQ ID NO: 6:

CTAGATGGC CACTCCCTCT	CTGGCGCTC	GCTCGCTCAC	TGAGGCCGGG	CGACCAAAGG	60
TCGCCCCGACG	CCA				73

20 (2) INFORMATION POUR LA SEQ ID NO: 7:

(i) CARACTERISTIQUES DE LA SEQUENCE:

- (A) LONGUEUR: 73 paires de bases
- (B) TYPE: acide nucléique
- (C) NOMBRE DE BRINS: double
- (D) CONFIGURATION: linéaire

(ii) TYPE DE MOLECULE: ADNC

(ix) CARACTERISTIQUE :

- (D) AUTRE INFORMATION: /product= Seq 4260

(xi) DESCRIPTION DE LA SEQUENCE: SEQ ID NO: 7:

30 AGCTTGGCGT CGGGCGACCT TTGGTCGCC	GGCCTCAGTG	AGCGAGCGAG	CGCGCAGAGA	60
GGGACTGGCC	AAT			73

(2) INFORMATION POUR LA SEQ ID NO: 8:

(i) CARACTERISTIQUES DE LA SEQUENCE:

- (A) LONGUEUR: 46 paires de bases
- (B) TYPE: acide nucléique
- (C) NOMBRE DE BRINS: double
- (D) CONFIGURATION: linéaire

(ii) TYPE DE MOLECULE: ADNC

(ix) CARACTERISTIQUE :

- (D) AUTRE INFORMATION: /product= Seq 4560

(xi) DESCRIPTION DE LA SEQUENCE: SEQ ID NO: 8:

ACCTTGACCC CGGGGCTTTG CCCGGGCGGC CTCAGTGAGC GAGCGA

46

(2) INFORMATION POUR LA SEQ ID NO: 9:

5 (i) CARACTERISTIQUES DE LA SEQUENCE:
 (A) LONGUEUR: 48 paires de bases
 (B) TYPE: acide nucléique
 (C) NOMBRE DE BRINS: double
 (D) CONFIGURATION: linéaire

10 (ii) TYPE DE MOLECULE: ADNC
 (ix) CARACTERISTIQUE :
 (D) AUTRE INFORMATION: /product= Seq 4561

(xi) DESCRIPTION DE LA SEQUENCE: SEQ ID NO: 9:

GCGCGCTCGC TCGCTCACTG AGGCCGCCG GCAAAGCCC GGGCGTCA

48

15 (2) INFORMATION POUR LA SEQ ID NO: 10:

20 (i) CARACTERISTIQUES DE LA SEQUENCE:
 (A) LONGUEUR: 50 paires de bases
 (B) TYPE: acide nucléique
 (C) NOMBRE DE BRINS: double
 (D) CONFIGURATION: linéaire

(ii) TYPE DE MOLECULE: ADNC
 (ix) CARACTERISTIQUE :
 (D) AUTRE INFORMATION: /product= Seq 4263

(xi) DESCRIPTION DE LA SEQUENCE: SEQ ID NO: 10:

25 GCGCGCAGAG AGGGAGTGGC CAACTCCATC ACTAGGGGTT CCTACTAGTG

50

(2) INFORMATION POUR LA SEQ ID NO: 11:

30 (i) CARACTERISTIQUES DE LA SEQUENCE:
 (A) LONGUEUR: 48 paires de bases
 (B) TYPE: acide nucléique
 (C) NOMBRE DE BRINS: double
 (D) CONFIGURATION: linéaire

(ii) TYPE DE MOLECULE: ADNC
 (ix) CARACTERISTIQUE :
 (D) AUTRE INFORMATION: /product= Seq 4264

(xi) DESCRIPTION DE LA SEQUENCE: SEQ ID NO: 11:

35 GATCCACTAG TAGGAACCCC TAGTGATGGA GTTGGCCACT CCCTCTCT

48

(2) INFORMATION POUR LA SEQ ID NO: 12:

40 (i) CARACTERISTIQUES DE LA SEQUENCE:
 (A) LONGUEUR: 12 paires de bases
 (B) TYPE: acide nucléique
 (C) NOMBRE DE BRINS: double

(D) CONFIGURATION: linéaire

(iii) TYPE DE MOLECULE: ADNc
(ix) CARACTERISTIQUE :
(D) AUTRE INFORMATION: /product= Seq 4674

5 (xi) DESCRIPTION DE LA SEQUENCE: SEQ ID NO: 12:

GATCTTTCGA AT

12

(2) INFORMATION POUR LA SEQ ID NO: 13:

10 (i) CARACTERISTIQUES DE LA SEQUENCE:
(A) LONGUEUR: 12 paires de bases
(B) TYPE: acide nucléique
(C) NOMBRE DE BRINS: double
(D) CONFIGURATION: linéaire

15 (iii) TYPE DE MOLECULE: ADNc
(ix) CARACTERISTIQUE :
(D) AUTRE INFORMATION: /product= Seq 4675

(xi) DESCRIPTION DE LA SEQUENCE: SEQ ID NO: 13:

CTAGATTTCGA AA

12

REVENDICATIONS

1. Adénovirus recombinant défectif comprenant une cassette capable de s'intégrer dans le génome des cellules infectées.
2. Adénovirus selon la revendication 1 caractérisé en ce que la cassette comprend une séquence d'ADN hétérologue et des éléments permettant son intégration dans le génome.
5
3. Adénovirus selon la revendication 2 caractérisé en ce que les éléments permettant l'intégration de la cassette sont d'origine virale.
4. Adénovirus selon la revendication 3 caractérisé en ce que la cassette contient au moins une séquence terminale inverse-répétée (ITR) d'AAV et une séquence d'ADN hétérologue.
10
5. Adénovirus selon la revendication 4 caractérisé en ce que l'ITR d'AAV est localisée en aval ou en amont de la séquence d'ADN hétérologue.
6. Adénovirus selon la revendication 4 caractérisé en ce que la cassette contient au moins une séquence d'ADN hétérologue bordée de deux ITR d'AAV.
15
7. Adénovirus selon l'une des revendications 4-6 caractérisé en ce que la ou les ITR sont des ITR strictes ou possédant des régions supplémentaires ou des délétions ne supprimant pas la capacité d'intégration.
8. Adénovirus selon l'une des revendications 3 à 7 caractérisé en ce que la ou les ITR sont des ITR d'AAV-2.
20
9. Adénovirus selon l'une quelconque des revendications précédentes caractérisé en ce que la séquence d'ADN hétérologue comprend un gène thérapeutique.
10. Adénovirus selon la revendication 11 caractérisé en ce que le gène thérapeutique est un gène codant pour un produit protéique ayant un effet thérapeutique, un gène codant pour un ou plusieurs peptides antigéniques, ou un gène ou une séquence antisens.
25

11. Adénovirus selon la revendication 10 caractérisé en ce que le gène thérapeutique code pour un produit protéique choisi parmi les enzymes, les dérivés sanguins, les hormones, les lymphokines : interleukines, interférons, TNF, les facteurs de croissance (érythropoïétine, G-CSF, M-CSF, GM-CSF, etc), les neurotransmetteurs ou leurs précurseurs ou enzymes de synthèse, les facteurs trophiques : BDNF, CNTF, NGF, IGF, GMF, aFGF, bFGF, NT3, NT5, HARP/pléiotrophine, etc; les apolipoprotéines : ApoAI, ApoAIV, ApoE, etc, la dystrophine ou une minidystrophine, la protéine CFTR associée à la mucoviscidose, les suppresseurs de tumeurs : p53, Rb, Rap1A, DCC, k-rev, les facteurs impliqués dans la coagulation : Facteurs VII, VIII, IX, les gènes intervenant dans la réparation de l'ADN, les gènes suicides (thymidine kinase, cytosine déaminase).

12. Adénovirus selon l'une des revendications 9 à 11 caractérisé en ce que la séquence d'ADN hétérologue comprend un gène thérapeutique sous le contrôle d'un promoteur.

15 13. Adénovirus selon la revendication 12 caractérisé en ce que le promoteur est un promoteur constitutif, régulé et/ou tissu-spécifique.

14. Adénovirus selon la revendication 13 caractérisé en ce que le promoteur est un promoteur viral.

20 15. Adénovirus selon la revendication 14 caractérisé en ce que le promoteur est choisi parmi les promoteurs E1A, MLP, CMV et LTR-RSV.

16. Adénovirus selon la revendication 12 caractérisé en ce que la séquence d'ADN hétérologue comprend également, entre le gène thérapeutique et le promoteur, une séquence de sécrétion.

25 17. Adénovirus selon l'une des revendications précédentes caractérisé en ce que la séquence d'ADN hétérologue comprend un gène thérapeutique et un gène marqueur, de préférence le gène de la β -galactosidase.

18. Adénovirus selon l'une des revendications précédentes caractérisé en ce qu'il est dépourvu au moins des régions de son génome qui sont nécessaires à sa réplication dans la cellule cible.

19. Adénovirus selon la revendication 18 caractérisé en ce qu'il sagit d'un adénovirus humain de type Ad5 ou Ad2 ou canin de type CAV-2.

20. Composition pharmaceutique comprenant un ou plusieurs adénovirus recombinants défectifs selon l'une des revendications 1 à 19.

5 21. Composition pharmaceutique selon la revendication 20 caractérisée en ce qu'elle est sous forme injectable.

22. Composition pharmaceutique selon la revendication 20 ou 21 caractérisée en ce qu'elle comprend entre 10^4 et 10^{14} pfu/ml, et de préférence 10^6 à 10^{10} pfu/ml adénovirus recombinants défectifs.

10 23. Cellule de mammifère caractérisée en ce qu'elle est modifiée par un adénovirus selon l'une des revendications 1 à 19.

24. Cellule selon la revendication 23 caractérisée en ce qu'il sagit d'une cellule humaine.

15 25. Cellule selon la revendication 24 caractérisée en ce qu'il sagit d'une cellule hématopoïétique, notamment CD34, ou tumorale.

26. Utilisation d'un adénovirus selon la revendication 6 pour la production d'AAV recombinants.

27. Utilisation selon la revendication 26 caractérisé en ce que les cellules productrices sont infectées par un adénovirus selon la revendication 6 et transfectées par un plasmide portant les gènes rep et cap.

28. Utilisation selon la revendication 26 caractérisé en ce que les cellules productrices sont co-infectées par un adénovirus selon la revendication 6 et par un adénovirus portant les gènes rep et cap.

29. Utilisation selon la revendication 26 caractérisé en ce que les cellules productrices contiennent les gènes rep et cap intégrés dans leur génome et sont infectées par un adénovirus selon la revendication 6.

30. Utilisation selon les revendications 26-29 caractérisé en ce que les cellules productrices sont les cellules 293.

31. Adénovirus selon la revendication 6 caractérisé en ce qu'il contient en outre une cassette d'expression des gènes rep et cap.

32. Adénovirus selon la revendication 31 caractérisé en ce qu'il est dépourvu de l'ensemble des gènes viraux à l'exception de la région E4.

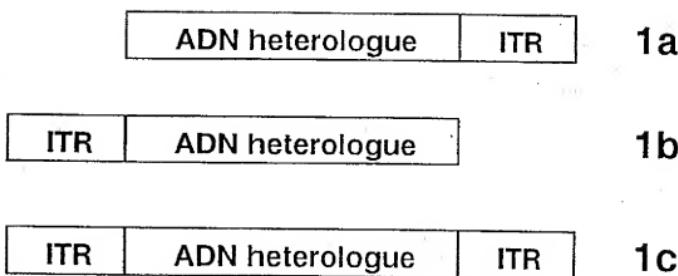


Figure 1

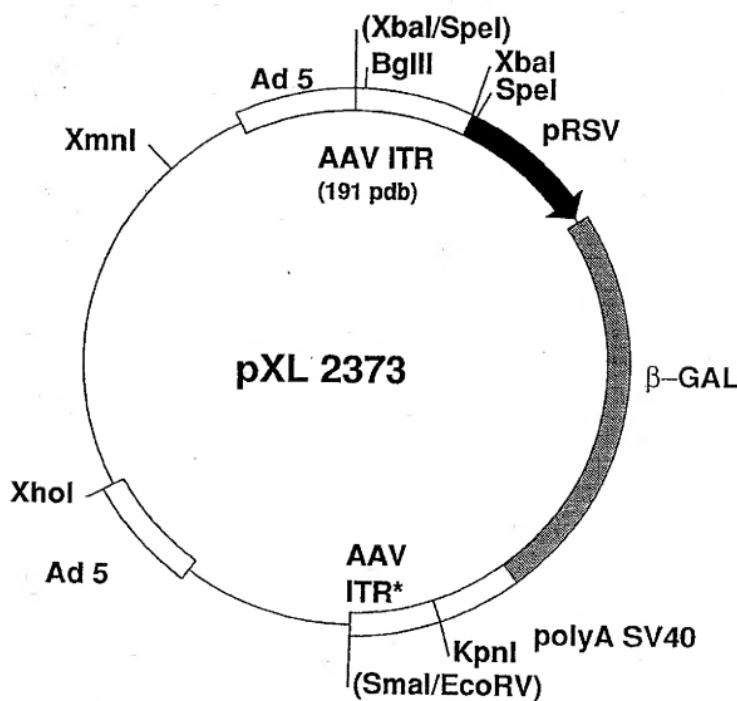


Figure 2

3/10

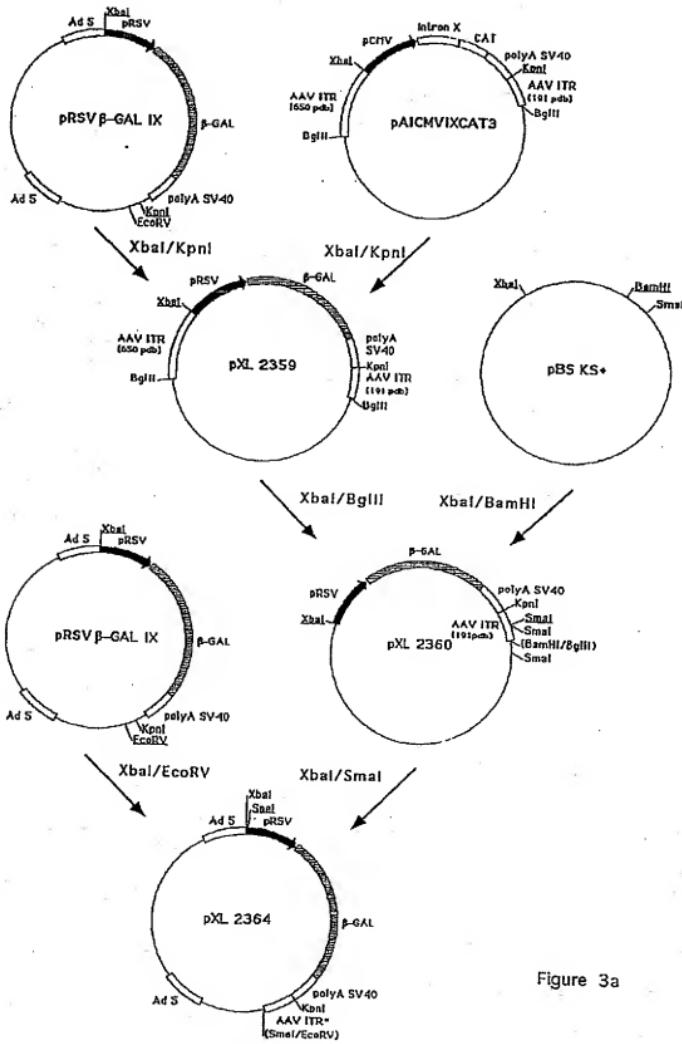


Figure 3a

4/10

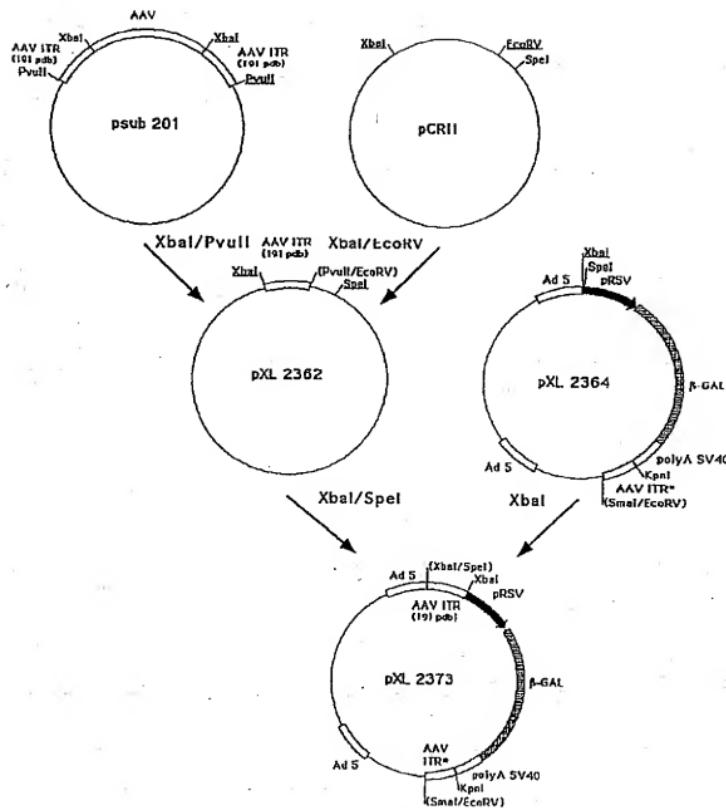


Figure 3b

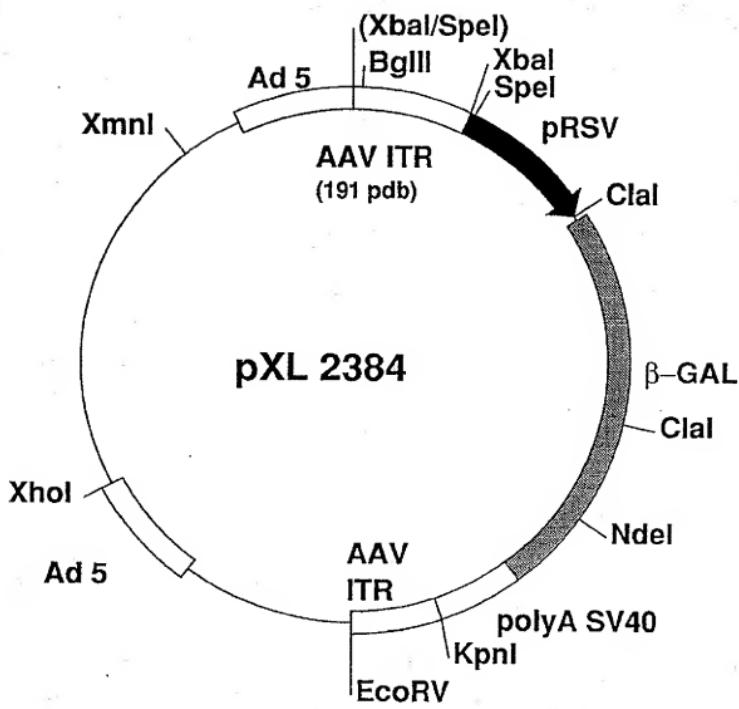


Figure 4

6/10

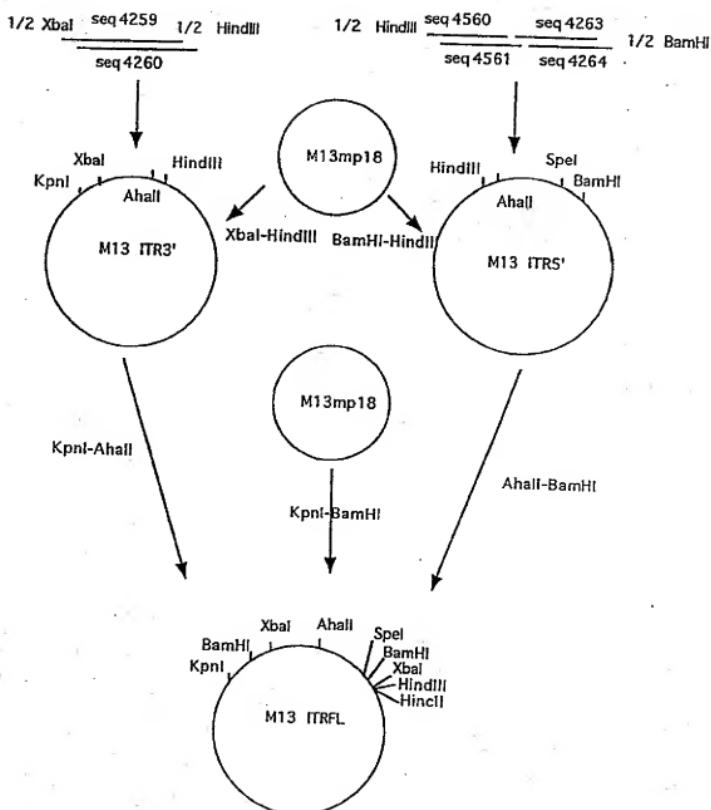


Figure 5

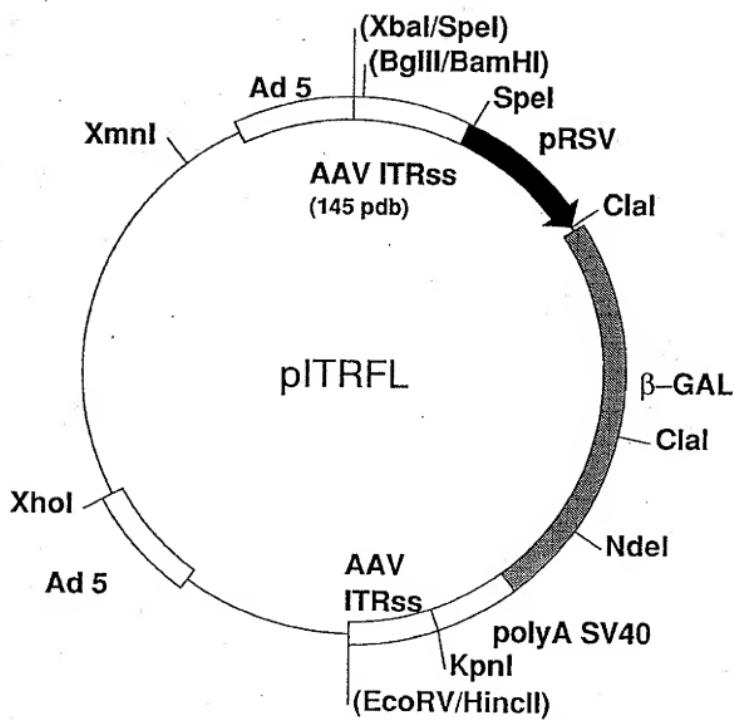


Figure 6

8/10

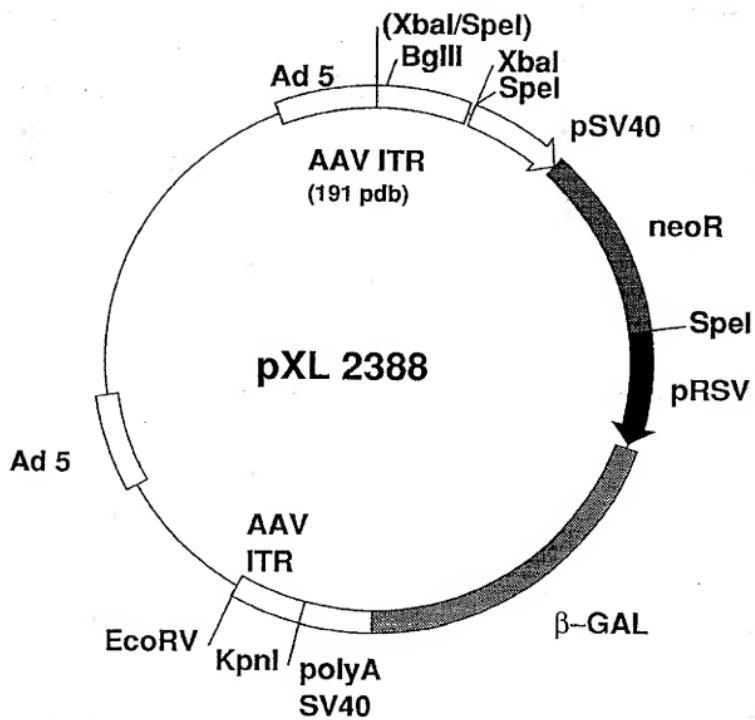


Figure 7

9/10

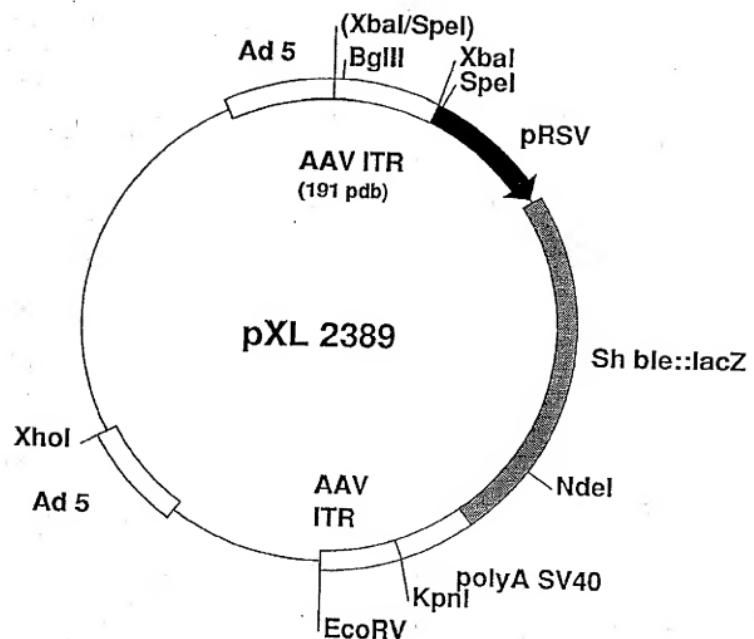


Figure 8

10/10

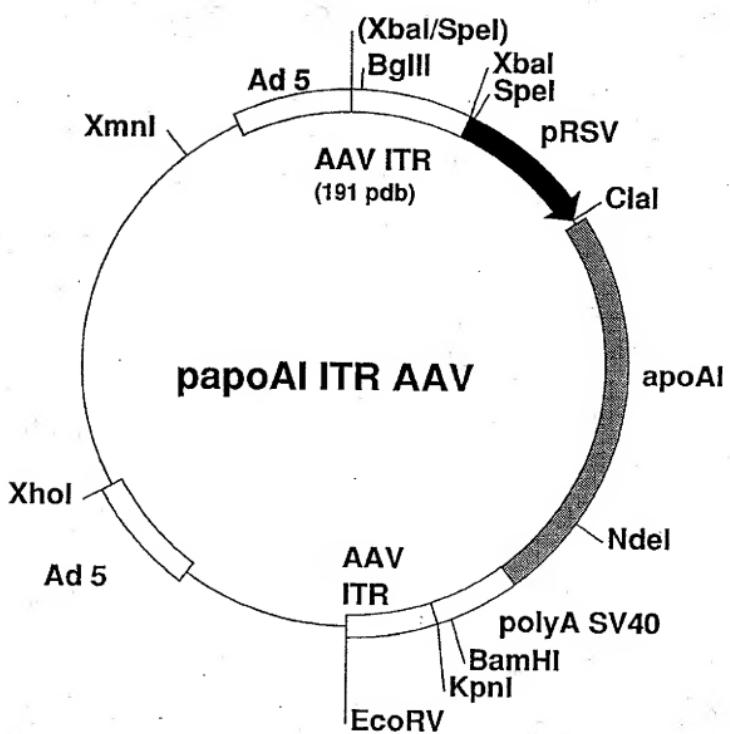


Figure 9

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Internal Application No
PCT/FR 95/00233

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER
 IPC 6 C12N15/86 A61K48/00 C12N7/01 A61K39/235 C12N5/10
 C12N15/12

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)
 IPC 6 C12N A61K C07K

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practical, search terms used)

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	GENE.. vol.119, no.2, 1992, AMSTERDAM NL pages 265 - 272 NAHREINI, P. ET AL. 'Cloning and integration of DNA fragments in human cells via the inverted terminal repeats of the adeno-associated virus 2 genome' see the whole document ---	1
P,A	EP,A,0 592 836 (AMERICAN CYANAMID COMPANY) 20 April 1994 see the whole document ---	1
A	WO,A,93 09239 (RESEARCH CORPORATION TECHNOLOGY) 13 May 1993 see claims 1-3,7,9,15-17,20 ---	1,26 -/-

 Further documents are listed in the continuation of box C. Patent family members are listed in annex.

* Special categories of cited documents :

- 'A' document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance
- 'B' earlier document but published on or after the international filing date
- 'C' document which may throw doubt on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another document on other special reason (as specified)
- 'D' document referring to an oral disclosure, test, exhibition or other means
- 'P' document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

- 'T' later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention
- 'X' document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone
- 'Y' document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art
- 'Z' document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search

19 May 1995

Date of mailing of the international search report

31.05.95

Name and mailing address of the ISA

 European Patent Office, P.B. 5818 Patentlaan 2
 NL - 2280 HV Rijswijk
 Tel. (+31-70) 340-2046, Tx. 31 651 epo nl,
 Fax: (+31-70) 340-3016

Authorized officer

Chambonnet, F

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Internal Application No
PCT/rR 95/00233

C(Continuation) DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	EP,A,0 488 528 (APPLIED IMMUNOSCIENCES) 3 June 1992 see the whole document -----	26
A	WO,A,93 24641 (UNITED STATES OF AMERICA: DEPARTMENT OF HEALTH AND HUMAN SERVICES) 9 December 1993 see the whole document -----	26

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

Internat'l Application No
PCT/FR 95/00233

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)		Publication date
EP-A-0592836	20-04-94	CA-A-	2106260	18-03-94
WO-A-9309239	13-05-93	US-A- AU-B- AU-A- EP-A- JP-T- PT-A-	5252479 657829 3134093 0566732 6504680 101040	12-10-93 23-03-95 07-06-93 27-10-93 02-06-94 31-05-94
EP-A-0488528	03-06-92	US-A- CA-A- JP-A- US-A-	5173414 2054517 5308975 5354678	22-12-92 01-05-92 22-11-93 11-10-94
WO-A-9324641	09-12-93	AU-B- CA-A- EP-A-	4598193 2136441 0644944	30-12-93 09-12-93 29-03-95

RAPPORT DE RECHERCHE INTERNATIONALE

Demande internationale No
PCT/rR 95/00233

A. CLASSEMENT DE L'OBJET DE LA DEMANDE	C12N15/86	A61K48/00	C12N7/01	A61K39/235	C12N5/10
	C12N15/12				

Selon la classification internationale des brevets (CIB) ou à la fois selon la classification nationale et la CIB

B. DOMAINES SUR LESQUELS LA RECHERCHE A PORTE

Documentation minimale consultée (système de classification suivi des symboles de classement)

CIB 6 C12N A61K C07K

Documentation consultée autre que la documentation minimale dans la mesure où ces documents relèvent des domaines sur lesquels a porté la recherche

Base de données électronique consultée au cours de la recherche internationale (nom de la base de données, et si cela est réalisable, terme de recherche utilisé)

C. DOCUMENTS CONSIDERES COMME PERTINENTS

Categorie *	Identification des documents cités, avec, le cas échéant, l'indication des passages pertinents	no. des revendications visées
A	GENE, vol.119, no.2, 1992, AMSTERDAM NL pages 265 - 272 NAHREINI, P. ET AL. 'Cloning and integration of DNA fragments in human cells via the inverted terminal repeats of the adeno-associated virus 2 genome' voir le document en entier ---	1
P, A	EP,A,0 592 836 (AMERICAN CYANAMID COMPANY) 20 Avril 1994 voir le document en entier ---	1
A	WO,A,93 09239 (RESEARCH CORPORATION TECHNOLOGY) 13 Mai 1993 voir revendications 1-3,7,9,15-17,20 ---	1,26
	-/-	

Voir la suite du cadre C pour la fin de la liste des documents

Les documents de familles de brevets sont indiqués en annexe

* Catégories spéciales de documents cités:

- "A" document définissant l'état général de la technique, non considéré comme particulièrement pertinent
- "B" document antérieur, mais publié à la date de dépôt international ou après cette date
- "L" document cité pour donner un doute sur une revendication de priorité ou cité pour déterminer la date de publication d'une autre citation ou pour une raison spéciale (elle qu'il indique)
- "O" document se référant à une divulgation orale, à un usage, à une exposition ou tous autres moyens
- "P" document publié avant la date de dépôt international, mais postérieurement à la date de priorité revendiquée

- "T" document ultérieur publié après la date de dépôt international ou la date de priorité et n'appartenant pas à l'état de la technique pertinent, mais cité pour comprendre le principe ou la théorie constituant la base de l'invention
- "X" document particulièrement pertinent; l'invention revendiquée ne peut être considérée comme nouvelle ou comme impliquant une activité inventive par rapport au document considéré isolément
- "Y" document particulièrement pertinent; l'invention revendiquée ne peut pas être considérée comme impliquant une activité inventive lorsque le document est associé à un ou plusieurs autres documents de même nature, cette combinaison étant évidente pour une personne du métier
- "Z" document qui fait partie de la même famille de brevets

1

Date à laquelle la recherche internationale a été effectivement achevée

19 Mai 1995

Date d'édition du présent rapport de recherche internationale

31 -05- 1995

Nom et adresse postale de l'administration chargée de la recherche internationale
Office Europeen des Brevets, P.B. 5818 Patenttaan 2
NL-2280 RY Rijswijk
Tel. (+31-70) 340-2040, Telex 31 651 epo nl,
Fax (+31-70) 340-3016

Fonctionnaire autorisé

Chambonnet, F

RAPPORT DE RECHERCHE INTERNATIONALE

Demande Internationale No
PCT/RN 95/00233

C (part) DOCUMENTS CONSIDERES COMME PERTINENTS		
Catégorie *	Identification des documents cités, avec, le cas échéant, l'indication des passages pertinents	no. des revendications visées
A	EP,A,0 488 528 (APPLIED IMMUNOSCIENCES) 3 Juin 1992 voir le document en entier ---	26
A	WO,A,93 24641 (UNITED STATES OF AMERICA: DEPARTMENT OF HEALTH AND HUMAN SERVICES) 9 Décembre 1993 voir le document en entier ---	26

RAPPORT DE RECHERCHE INTERNATIONALE

Renseignements relatifs aux n. ... et de familles de brevets

Germany's *territorialis No*

PCT/EP 95/00233

Document brevet cité au rapport de recherche	Date de publication	Membre(s) de la famille de brevet(s)	Date de publication
EP-A-0592836	20-04-94	CA-A-	2106260
WO-A-9309239	13-05-93	US-A- AU-B- AU-A- EP-A- JP-T- PT-A-	5252479 657829 3134093 0566732 6504680 101040
			12-10-93 23-03-95 07-06-93 27-10-93 02-06-94 31-05-94
EP-A-0488528	03-06-92	US-A- CA-A- JP-A- US-A-	5173414 2054517 5308975 5354678
			22-12-92 01-05-92 22-11-93 11-10-94
WO-A-9324641	09-12-93	AU-B- CA-A- EP-A-	4598193 2136441 0644944
			30-12-93 09-12-93 29-03-95